

Aus der Klinik und Poliklinik für Strahlentherapie und Röntgendiagnostik
der Universität in Marburg/L.
Direktor: Professor Dr. Heß

VERLAUFSKONTROLLEN DER ANTIPROTEASENAKTIVITÄT
BEI WALKER-CARZINOM 256 TRAGENDEN
SPRAGUE-DAWLEY-RATTEN;
EINSATZ VON ANTIPROTEASEN ZUR TUMORTHERAPIE

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades der Zahnmedizin
dem Fachbereich Humanmedizin der Philipps-Universität
Marburg an der Lahn

vorgelegt von

Manfred Bäcker aus Steinperf/Marburg-Biedenkopf

Marburg 1977

Aus der Klinik und Poliklinik für Strahlentherapie und Röntgendiagnostik
der Universität in Marburg/L.

Direktor: Professor Dr. Heß

VERLAUFSKONTROLLEN DER ANTIPROTEASENAKTIVITÄT
BEI WALKER-CARZINOM 256 TRAGENDEN
SPRAGUE-DAWLEY-RATTEN;
EINSATZ VON ANTIPROTEASEN ZUR TUMORTHERAPIE

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades der Zahnmedizin
dem Fachbereich Humanmedizin der Philipps-Universität
Marburg an der Lahn

vorgelegt von

Manfred Bäcker aus Steinperf/Marburg-Biedenkopf

Marburg 1977

Für die Übernahme des Referats möchte ich
Herrn Prof.Dr.F.Heß meinen Dank aussprechen.

Gleichzeitig möchte ich Herrn Prof.Dr.A.Ahrens
für die Übernahme des Koreferates danken.



INHALTSVERZEICHNIS

I. EINLEITUNG

I. 1.	Proteasenzugabe als Wachstumsimpuls.....	1- 3
I. 2.	Wachstumsstimulierung isolierter Kerne.....	3- 4
I. 3.	Membrantheorie zur Proteasewirkung.....	5- 6
I. 4.	Exocytose von Proteasen bei Normalzellen.....	6- 8
I. 5.	Exocytose von Proteasen bei Tumorzellen.....	8-12
I. 6.	Fibrinolytische Wirkung von Tumoren.....	12-14
I. 7.	Proteasenapplikation als Tumorthherapie.....	14-16
I. 8.	Erhöhte Alpha-1-Antitrypsinkonzentration im Plasma tumorkranker Patienten.....	16-19

II. MATERIAL UND METHODEN

II. 1. Impftechnik.....	20
II. 2. Blutgewinnung.....	21
II. 3. Alpha-1-Antitrypsinbestimmung.....	21-25
II. 4. Nachweis der polyvalenten Trypsininhibitoren Antagasan und Trasylol im Plasma.....	25-27
II. 5. Nachweis des Trypsininhibitors (400000 IE) im Urin.....	27-28
II. 6. Nachweis von Trasylol und Antagasan im Tumorgewebe.....	29-30
II. 7. Statistische Berechnung.....	31

III. ERGEBNISSE

III. 1. Alpha-1-Antitrypsin	Tab. I-V
	Abb. III. 1.....32-34
III. 2. Einzelnachweise der Antiproteasen	
	Abb. III. 2-III.6..35-39
III. 3. Antiproteasentherapie	Abb. III. 7-III.10.40-43
III. 4. Thrombinzeit	Abb. III.11.....44
III. 5. Heparin-Nachweis	Abb. III.13.....45

III. 6. Heparin-Therapie	Abb. III.14-III.15...	46-47
III. 7. Ergebnisse (Fortsetzung).....		48-49
III. 8. Statistische Auswertung zu	Abb. III.1+III.11....	50-51

IV. <u>DISKUSSION</u>		52-55
-----------------------------	--	-------

V. <u>ZUSAMMENFASSUNG</u>		56
---------------------------------	--	----

VI. <u>LITERATURVERZEICHNIS</u>		57-64
---------------------------------------	--	-------

Meinen Eltern in Dankbarkeit gewidmet

Angenommen vom Fachbereich

Humanmedizin am: 27. Januar 1978

gedruckt mit Genehmigung

des Fachbereichs

Dekan: Prof. Dr. Neurath

Referent: Prof. Dr. Heß

Correferent: Prof. Dr. Ahrens

I. E I N L E I T U N G

Während der letzten fünfzig Jahre hat die biochemische Methodik in der experimentellen Tumorforschung einen immer breiteren Raum eingenommen. In den zahllosen Untersuchungen über die chemische Zusammensetzung und den Stoffwechsel der Tumoren zog man sowohl Impfgeschwülste wie auch spontan und durch Karzinogene entstandene Tumoren ein.

So haben sich in den letzten Jahren Befunde gehäuft, nach denen maligne Tumoren vermehrt proteolytische Enzyme aufweisen. Welche Bedeutung die Proteasen in der Regulierung des Zellwachstums haben, soll zunächst Gegenstand dieser Einleitung sein und zugleich überleiten zur vorliegenden Fragestellung nach den therapeutischen Konsequenzen.

I. 1. PROTEASENZUGABE ALS WACHSTUMSSTIMULUS

Zunächst stellt sich die Frage, ob Proteasen das Wachstum von Zellkulturen aktivieren. Grundsätzlich kann man die Wachstumsregulierung in einer Kultur oder allgemein im Organismus als Funktion der Zelldichte betrachten. Gesunde Zellen besitzen die Fähigkeit des gegenseitigen Erkennens, ihre Membranstruktur bestimmt die jeweilige gewebliche Zuordnung. Werden die Zytomembranen nun z.B. durch maligne transformierende Viren verändert, geht im betroffenen Zellverband die Gewebstruktur und mit ihr die Kontakthemmung verloren, es kommt zu ungezügelter Wachstum.

BURGER gelang es, in einer Kultur normaler, konfluenter Hühnerembryonalzellen durch Zugabe von Proteasen (Trypsin, Pronase und Ficin) einen Wachstumsimpuls zu setzen. Die zunächst zur Zelldichte umgekehrt proportionale H^3 - Thymidininkorporation stieg an, mit ihr die Mitoserate und die Zellzahl. Nach der Anwendung eines Sojabohneninhibitors ging der Effekt zurück.

Der Mechanismus der Wachstumsstimulation bestand in einem proteolytischen Angriff von Proteasen unmittelbar auf die Zellmembran. Hypothetisch stellte man fest, daß Trypsin oberflächliche Erkennungsstellen der Zytomembranen inaktiviert, wodurch die Zellen nicht mehr in der Lage sind, die Nachbarzelle zu erkennen. (2)

Die gleichen Parameter wurden in einer Arbeit ähnlichen Inhalts benutzt, in der die Stimulation von Kaninchen-Appendixzellen und Sacculus rotundus-Zellen durch das Mitogen Phythaemagglutinin (=PHA) untersucht wurde. Bei zusätzlicher vorheriger Proteasenbehandlung der Kulturen mit Pronase und Trypsin zeigte sich eine deutlich erhöhte Sensibilität gegenüber dem Mitogen. Zurückgeführt wurde diese Erscheinung auf die Abspaltung sterisch hindernder Peptide der Membranoberfläche durch die Proteasen, wodurch die PHA-Stimulierung verbessert wurde. (3)

Um die Endozytose von Trypsin zu verhindern, band man es in einem weiteren Versuch kovalent an große Trägerpolymere. Es übte jedoch auch in dieser Modulation seine bekannte Wirkung aus, d.h. es verminderte in der Mäuse-Fibroblastkultur die Kontakthemmung und erhöhte die Dichte. Damit war nachgewiesen, daß die proteolytische Wirkung sich auf die Membranoberflächen entfaltet. Wie die Membranveränderungen weitergeleitet werden, wurde nicht geklärt. (4)

Es liegen Versuchsreihen mit Ratten vor, die die oben geschilderten in vitro-Ergebnisse auch im Tierexperiment bestätigen.

Papain-Injektion bei Ratten führte z.B. zu einer Steigerung der Mitosen in Leber und Niere, Thrombin wirkte nicht weniger mitogen. (5,6)

Auch Trypsin und "Wobe-Mugos", ein Enzympräparat, intraperitoneal bei Ratten injiziert, führte zu signifikanter Erhöhung des Phosphateinbaus in die Histone F1, F1" und 2 Fb der Leber.

Wie der Autor vermutet, könnte die durch proteolytische Enzyme stimulierte DNS-Synthese und Zellproliferation Folge einer gesteigerten Phosphorylierung von Kernproteinen sein. (7)

An anderer Stelle untersuchte man die Veränderungen, die eine intraperitoneale Injektion von Papain bei Ratten und Mäusen setzt. Die mitogene Wirkung der Proteasen konnte durch die Proliferation der Leber nachgewiesen werden. Jedoch zeigte diese Analyse auch, daß Trypsin, Kollagenase und Pronase keinen signifikanten Anstieg verursachen, bedingt dadurch, daß diese Proteasen eben toxischer sind und weniger gut durch die Leberkapsel permeieren. Ihre proliferative Wirkung auf Zellen konnte daher zunächst nur in vitro bestätigt werden, wobei die perizelluläre Architektur stark gestört wurde; es kam zum Loslösen membrangebundener Zuckeranteile, gewebsspezifischer Oberflächenantigenen und Reaktionsänderungen gegenüber Pflanzenlektinen. Im Tierexperiment waren diese Architekturveränderungen zeitlich begrenzt und reversibel, wobei ein histochemisch nachgewiesenes vorübergehendes Verschwinden perizellulären sauren Materials im Vordergrund stand. Ob dies auf losgelösten, membrangebundenen sauren Mucopolysacchariden oder Sialinsäure-enthaltenden Glycoproteinen beruht, bleibt zu klären. Die zusätzliche Erkenntnis, daß der Glucosamin- H^3 Stoffwechsel durch die Proteasenapplikation verändert war, eröffnete eine weitere Erklärungsmöglichkeit: Die verminderte Glucosaminpermeabilität und -verwertung führt zu herabgesetzter Biosynthese von Glycoproteinen und/oder sauren Mucopolysacchariden. (8)

I. 2. WACHSTUMSSTIMULIERUNG ISOLierter KERNE

Während die bisherigen Arbeiten sich mit der Wirkung von Proteasen auf intakte Zellen und Zellkulturen befaßten, ist anderenorts eine Wachstumsstimulierung isolierter Kerne durch Proteasenzugabe nachgewiesen worden. Meßgröße war die "template capacity".

Sie ist definiert als die Größe der Inkorporation von ^3H -GTP in die RNS bei Zugabe von exogener RNS-Polymerase. Sie war erheblich erhöht, obwohl die Zugabe von Trypsin zu isolierten Kalbsthymuskernen eine Zerstörung deren Struktur bedingte. Erhaltung der Struktur bei gleichzeitig erhöhter "template capacity" erreichte man nur bei gleichzeitiger Applikation von Trypsin und dessen kristallinem Sojabohnen-Inhibitor. Analoge Befunde ergaben sich bei Inkubation von Lymphozytenkernen, nachdem die Lymphozyten mit Phythaemagglutinin vorinkubiert worden waren. Im Vergleich ergab sich, daß die "template capacity" der PHA- und Trypsin-behandelten Kerne relativ geringer angestiegen war als die Aktivität der Kerne, die lediglich PHA-vorbehandelt waren. Im absoluten Maß übertraf natürlich die "template capacity" der doppelt inkubierten Kerne die der ausschließlich mit PHA inkubierten; die Schlußfolgerung war, daß durch aufgepfropfte Trypsinbehandlung zusätzliche Genorte zur RNS-Synthese bereitgestellt wurden. (10,11)

Einen enzymgebundenen Reaktionsmechanismus vermutete man in einem Versuch mit chinesischen Hamsterzellen, von denen man ein "broken cellular lysate" mit erhaltenen Kernen herstellte. Die Messung der DNS-Synthese nach Inkubation mit Trypsin und Chymotrypsin ergab eine 5-fache Erhöhung. Zunächst wurde ausgeschlossen, daß diese Zunahme auf ein vermehrtes Herauslösen von Histonen aus der alpha-Helix der DNS zurückzuführen sei. Man vermutete schließlich eine Aktivierung der DNS-Polymerase. (12)

Die Aktivierung eines Enzyms soll auch Ursache einer 20-fachen DNS-Methylierung isolierter Kerne von Seeigel-embryonen sein; die Inkubation der Kultur mit Trypsin war in Gegenwart von S-adenosyl-L-methionin (= aktiviertes Methionon) durchgeführt worden. (13)

I. 3. MEMBRANTHEORIEN ZUR PROTEASENWIRKUNG

Gegenüber den zuletzt beschriebenen Mechanismen erscheinen die unter I. 1. bereits angesprochenen Membrantheorien plausibler; denn wie sollte z.B. Trypsin, das an Trägerpolymere gebunden nicht in die Zelle diffundieren kann, anders seine Wirkung entfalten als über Membranveränderungen? Deshalb sei hier eine Arbeit zitiert, die versucht, ein Modell der Lymphoblastentransformation zu entwickeln, in dessen Mittelpunkt Ereignisse an den Zytomembranen stehen.

Man ging davon aus, daß auf der Membranoberfläche von Lymphozyten sogenannte "trigger peptide" oder "Detendomer" gebunden sind. Durch die unspezifisch mitogene Wirkung von Trypsin, Chymotrypsin, Papain und PHA wurde der "Detendomer" proteolytisch geteilt und damit die Transformation eingeleitet. Trypsininhibitoren aus Soja- und Limabohnen, ϵ -Aminocaprinsäure und Chloroquin hemmten diesen Effekt. Die nähere Charakterisierung des "Detendomers" ergab, daß er in seiner Sequenz zwei Peptiden aus der Mitte des Basisproteins von Myelin sowie der H-Kette des IgG-Moleküls entspricht. Diese drei Peptide sind Substrat der UDP-NAGA-Transferase und in der Bindung an dieses Enzym resistent gegenüber proteolytischem Angriff. Dabei wird NAGA (=N-acetylgalaktosamin) enzymatisch an das Threonin im Peptid gebunden und dieses so moduliert, daß der "Detendomer" PHA-resistent wird.

Aus der betrachteten Blastentransformation zog der Autor, zunächst noch hypothetisch, eine Parallele zum malignen Verhalten von Zellen, das ebenfalls durch die Proteolyse eines "trigger peptide" ausgelöst werden könnte. Eine daraus ableitbare Tumorthherapie stößt jedoch auf das Problem, daß Inhibitorenapplikation zur Hemmung eines Tumorstwachstums gleichzeitig eine Lymphoblastentransformation behindern würde. (14)

Auch KAPLAN und BONA sahen ultrastrukturelle Veränderungen der Glycocalyx durch Proteasen-anwendung ausgelöst.

Sie ermittelten an Milzzellen von AKR-Mäusen sowie peripheren menschlichen Blutlymphozyten eine 10- bis 20-fache Stimulierung der H^3 -Thymidininkorporation. (15) Ob es sich allerdings bei den Membranveränderungen um eine Exposition von Kalium-Bindungsstellen handelt mit folgender Aktivierung der Kationen-Pumpe (16) oder um die Aktivierung anderer membrangebundener Transportsysteme und Enzyme, blieb dahingestellt. Die Autoren erwähnen abschließend Ergebnisse von WEISMANN (17), die zeigen, daß bei stimulierten Leukozyten eine Extrusion lysosomaler Enzyme, einschließlich Proteasen, zu beobachten ist. Danach stellen sie folgende Hypothese auf: Mitogene und Antigene bewirken die Freisetzung endogener Proteasen auf die Zelloberfläche von Leukozyten. Ihre proteolytische Aktivität leitet zu den weiteren Schritten der Blastentransformation über. Exogene Proteasen (deren Applikation und Wirkung wir seither betrachtet haben) schließen diesen Weg kurz, von dem man annimmt, daß er bei allen Transformationen gleich ist. Es sei hier noch auf eine Arbeit aus dem Jahre 1966 von MAZZI et al. hingewiesen. Dort war bereits eine erhöhte Blastenkonzentration in einer Human-Lymphozytenkultur gemessen worden, nachdem sie mit Trypsin und Chymotrypsin inkubiert worden war. (15)

I. 4. EXOCYTOSE VON PROTEASEN BEI NORMALZELLEN

Das oben angeführte Ergebnis von WEISMANN, demzufolge stimulierte Leukozyten eine erhöhte Extrusion lysosomaler Enzyme zeigen, leitet über zu einer weitergehenden Forderung. Wenn nämlich Proteasenzugabe in Zellkulturen und Applikation bei Ratten und Mäusen zu Zellvermehrung führt, sollte man erwarten, daß durch die Freisetzung zelleigener Proteasen eine autonome Regenerationsfähigkeit und eventuell die Entgleisung des Tumorwachstums verursacht wird.

So wurde aus Lysosomen von Granulozyten eine Protease isoliert, die Histone hydrolysiert (18), sowie eine Elastase, die im Gegensatz zur Pankreaselastase durch Sojabohnen-Trypsininhibitor und Trasylol gehemmt wurde. (19)

Schließlich erhielt man, wiederum aus Granulozyten, ein Lysosomenpräparat, das Lymphozyten und Makrophagen zur Blastenbildung anregte. Es wurde nachgewiesen, daß hierbei Proteasen eine wichtige Rolle spielen, denn die Zugabe des Proteolysehemmers Zymophren stoppte die Blastenbildung. (20,21)

Bei partieller Hepatektomie war eine erhöhte endogene Freisetzung von Kathepsin meßbar; dadurch wurden die Kontaktverhältnisse im Organgefüge so geändert, daß es zu verbesserter Regeneration kam. RNS- und DNS-Synthese sowie Mitosen konnten jedoch durch intraperitoneale Injektion der Proteolysehemmer "Leupeptin" und "Pepstatin" gehemmt werden. (8, 9)

Eine weitere Veröffentlichung beschäftigt sich mit dem invasiv wachsenden Rattentumor des Xyphoidknorpels, der Zeichen von lytischem Abbau der Knorpelmatrix im Tumorrandbereich erkennen ließ. Eine vergleichbare Lyse der Matrix erreichte man durch in vivo-Applikation von Vitamin A oder Papain; dabei werden saure Proteasen und wahrscheinlich andere lysosomale Enzyme aus den Chondrozyten freigesetzt. Durch ein aus Tumorgewebe isoliertes Lysosomenpräparat war der lytische Abbau gesunder Knorpelmatrix möglich. (37) Alle Ergebnisse zusammengekommen lassen vermuten, daß die Degradation der Matrix im Randbereich durch lysosomale Enzyme aus dem Tumorgewebe herbeigeführt wird.

HIRSCHHORN wies eine vermehrte Hydrolasenproduktion stimulierter Zellen nach. Er isolierte eine Suspension menschlicher Blutlymphozyten, fraktionierte sie und inkubierte die subzelluläre Lysosomenfraktion mit dem Mitogen Phythämagglutinin. Im zugehörigen Überstand ergab sich eine Anreicherung saurer Hydrolasen (beta-Glucuronidase, saure Phosphatase), zurückzuführen auf eine Umverteilung aus der "granular fraktion" in die nichtsedimentierende Fraktion, wobei die absolute Hydrolasenmenge konstant blieb. Allerdings führte nur die Inkubation intakter Zellen, nicht die isolierter Granulas zur Hydrolasenfreisetzung.

Damit lag der Schluß nahe, daß PHA nur über frühzeitig induzierte Veränderungen in der Lymphozytenmembranoberfläche eine Hydrolasenexozytose herbeiführte (22). Weiterhin untersuchte HIRSCHHORN die Reaktion von Zellkulturen auf ϵ -Aminocaprinsäure-Applikation, nachdem er deren C^{14} -Thymidin-Inkorporation durch PHA erheblich gesteigert hatte. Er schloß zunächst in Versuchsreihen aus, daß die Inkubation mit dem Proteolysenhemmer zu irreversiblen oder unspezifischen Schädigungen der Zellfunktion geführt hatte. Das Ergebnis war, daß C^{14} -Uridin und C^{14} -Leucin-Inkorporation, DNS-, RNS-, sowie Proteinsynthese durch ϵ -Aminocaprinsäure gehemmt wurden. Mit TLCK und TPCK sowie TAME (nur hochkonzentriert) war der gleiche inhibitorische Effekt erzielbar.

TLCK = tosyl lysin chloromethyl keton

TPCK = tosyl phenylalanin chloromethyl keton

TMAE = tosyl arginin methyl ester

Da die Hemmung jedoch ausschließlich bei frühzeitiger Zugabe wirksam wurde, vermutete man, daß die Inhibitoren in ein proteolytisches System innerhalb der Lymphozyten einfließen. Dieses soll Teilschritt in einem Überträgermechanismus sein, der durch membranvermittelte Aktivierung der Adenylcyclase in Gang kommt und intracellulär durch Freisetzung von zyclischem AMP fortgesetzt wird. (23)

I. 5. EXOZYTOSE VON PROTEASEN BEI TUMORZELLEN

Die bisherigen Ergebnisse bezogen sich ausschließlich auf stimulierte gesunde Zellen; ob auch maligne transformierte Zellen sowie Tumorzellen eine vermehrte Produktion proteolytischer Enzyme aufweisen, wird im folgenden erörtert.

Man ging auch hierbei zunächst, wie es FOX demonstriert, von Membranveränderungen aus. Durch die spezifische Bindung eines fluoreszierenden Weizenkern-Agglutinins gelang die Lokalisation einer wichtigen Membranstelle.

Diese ist bei normalen 3T3-Zellen ausschließlich bei der Mitose exporntiert, während sie bei maligne transformierten 3T3-Zellen ständig exponiert war und deren Agglutination verursachte. Um nun zu beweisen, daß diese Membranänderung auf Proteasenwirkung zurückzuführen war, behandelte FOX gesunde Zellen mit Trypsin. Dabei wurde ebenfalls eine Membranstelle exponiert und die Kulturen zeigten das Verhalten maligne transformierter Zellkultur. Nur spezifische "Hapten Inhibitoren" vermochten, Agglutination und Fluoreszenz zu verhindern. (24)

An anderer Stelle ist von Pflanzenagglutininen die Rede, die die Tendenz haben, transformierte- und Tumorzellen besser als ihre normalen parentalen Zellen zu agglutinieren. Die molekulare Basis dieser Erscheinung wird nicht geklärt. Man weist lediglich nach, daß eine kurze proteolytische Behandlung normaler Zellen die gleichen charakteristischen Veränderungen verursachte. Eine normale Fibroblastenkultur zeigte also nach Proteasenzugabe Verlust der Wachstumskontrolle, d.h. erhöhte DNS-Synthese und Einleitung einer Zellteilung. Daneben ergab die Messung der intrazellulären c-AMP-Konzentration eine vorübergehende Abnahme. Vergleichbare Erscheinungen konnten auch an normalen Fibroblasten während der Mitose beobachtet werden. Da durch kovalente Bindung der Proteasen an Trägerpolymere deren Endozytose ausgeschlossen wurde, lag der allerdings noch hypothetische Schluß nahe: Proteasen verursachen eine Membranveränderung, die durch zyclisches AMP intrazellulär weitervermittelt, schließlich einen Wachstumsimpuls setzt. Der Autor unterstützt seine Theorie durch eigene, frühere Ergebnisse. Danach verursachte die Zugabe von Leukämie-Zellen zu einer Normalzellenkultur einen erheblichen Wachstumsimpuls der gesunden Zellen. Eine Plasmamembranfraktion der Leukämie-Zellen wirkte ebenfalls stimulierend, während die zusätzliche Gabe des Proteaseninhibitors TLCK die Wachstumsantwort verhinderte. (25)

Einen ähnlichen Vergleich zwischen normalen und maligne transformierten Zellen stellte SCHNEBLI an. Als Parameter der Proteolyse verwandte er die Produktion trichlor-essigsäurelöslichen Materials aus C^{14} -Chlorella-Protein. Er ermittelte eine 3 bis 10 mal stärkere "proteaselike activity" transformierter 3T3-Zellen gegenüber den normalen parentalen Zellen. Die hypotone Behandlung normaler Zellen bewies, daß die Aktivität auch in diesen latent vorhanden ist; denn dabei stieg auch deren proteaseähnliche Aktivität signifikant an. SCHNEBLI lokalisierte die Aktivität auf der Membranoberfläche; zum Beweis fügte er L1210- und Ehrlich Asziteskarzinom-Zellen zu einer 3T3-Monolayer-Kultur, wobei die Tumorzellen unmittelbar proteinhaltiges Oberflächenmaterial der Normalzellen abzulösen vermochten. D.h. die "proteaselike activity" könnte wenigstens teilweise für die Oberflächenveränderungen in transformierten Zellen verantwortlich sein, welche ihrerseits den Verlust der Wachstumsregulation (z.B. Kontaktinhibition) verursachen könnte. Diese Annahme wurde weiter gestützt durch den Befund, daß Proteasenhemmer aus drei verschiedenen Stoffklassen (TAME, TLCK und Ovomucoid) die Wachstumsrate transformierter Zellen in dosisabhängiger Weise reduzieren. Sie hatten auf normale 3T3-Zellen keinerlei Einfluß. (26)

An anderer Stelle induzierte man die Bildung von Antikörpern gegen Kathepsin B₁ und markierte sie mit FITC (= Fluorescein-Isothiocyanat). Mittels dieser Antikörper gelang der Nachweis vermehrter Rezeptorgruppen auf Membranen transformierter Zellen, besonders in mitotischen Stadien. Normale, differenzierte Zellen zeigten an ihrer Oberfläche keinerlei positive Fluoreszenz. Man schloß daraus auf eine veränderte Stabilität und Funktion des lysosomalen Systems, mit der eine erhöhte Freisetzung lysosomaler Enzyme korreliert ist. (27)

Bereits 1961 hatte HOLMBERG eine erhöhte Sekretion lysosomaler Enzyme in Tumorzellen nachgewiesen. (28)

Das gleiche Ergebnis zeigte ein Versuch mit ICR-Swiss-female Mäusen, die mit 1, 12 Dimethylbrenzanthracen, Croton Öl und 3-Methylcholanthren (= MCA) behandelt wurden. Nur die MCA-behandelten Tiere entwickelten Hautkrebs mit stark erhöhten Kathepsin-, beta-Glucuronidase- und saure Phosphatase-Konzentrationen im Plasma. Man stellte die Hypothese auf, daß die Karzinogene die Verdauungsfunktion der Lysosomen zerstören, sowie deren Lipidmembran peroxidieren, und somit einen Enzymaustritt bewirken. (29)

Ohne den lysosomalen Ursprung der Enzyme zu belegen, ermittelte ein anderer Autor eine erhöhte Glycosidase- und Proteasekonzentration in RNS- und RSV-transformierten 3T3-Zellkulturen. In diesem so geänderten Enzymspiegel sah er auch die Ursache für die Modifizierung der Glycopeptide, Endzucker und Aminosäurereste der Zytomembranen, wodurch Zellerkennung und Permeabilität grundlegend verändert werden. (30)

BOSSMANN gelang auch, in einem Versuch mit chemisch synchronisierten Mäuseleukämiezellen nachzuweisen, daß diese während und unmittelbar nach der Mitose eine Serin-Protease abgeben, deren pH-Optimum im physiologischen Bereich liegt. (31)

RUBIN spricht von einem "overgrowth stimulating factor" (= OSF), den er als dialysierbar und thermolabil charakterisierte. Er isolierte ihn aus Hühnerembryokulturen, die mit Rous-Sarkoma-Viren transformiert waren. Die Wirkung des OSF auf eine konfluente Kultur normaler Zellen lag in einer Erhöhung der H^3 -Thymidininkorporation, der Mitoserate sowie einer Zellzahlverdopplung. Trypsin und Pronase zeigten nach Zugabe zu der Kultur eine vergleichbare Wirkung. Mit der zusätzlichen Erkenntnis, daß in vielen Tumoren die Peptidasen stark erhöht sind (32), und Trypsin "tumortype agglutinins" in normalen Zellen demaskiert (33), vermutet RUBIN im OSF ebenfalls eine Peptidase oder Protease.

Es ist von Interesse, daß auch der mesenchymale "growth factor" sowie der "nerv-growth-factor", jeweils aus der Mäuseunterkieferdrüse isoliert, eine Aktivität aufweisen, die Peptidasen und Esterasen vergleichbar ist. (34)

I. 6. FIBRINOLYTISCHE WIRKUNG VON TUMOREN

Ich habe bisher versucht, darzustellen, inwieweit Proteasenbildung und Tumorwachstum miteinander korreliert sind. Dabei hat sich eine bemerkenswerte Verbindung zwischen proteolytischen Membranveränderungen und alteriertem Wachstumsverhalten herausgebildet. Im folgenden werde ich die proteolytische Aktivität von Tumoren weiterbehandeln, jetzt allerdings im Hinblick auf eine Fibrinolyseaktivierung.

Bereits 1925 hatte FISCHER darauf hingewiesen, daß Explantate von virusbedingten Hühnersarkomen eine Lyse von Plasmagerinnseln bedingen. (35)

Mittels einer Fibrin-Platten-Methode untersuchten andere die fibrinolytische Aktivität sowie die Produktion eines Plasminogenaktivators in menschlichen Tumoren. Dabei ergab sich für Brustkarzinome sowie bestimmte Adenokarzinome des Dickdarms eine erhöhte Aktivatorproduktion, für Sarkome eine stimulierte fibrinolytische Aktivität. (36)

Vögel- und Säugetier-Fibroblastkulturen, mit DNS- und RNS-Tumor-Viren infiziert, zeigten erhöhte fibrinolytische Aktivität. Darüberhinaus wurde aus Serum tumorkranker Tiere ein Proteaseninhibitor des Plasmin isoliert, der in normalen Seren fehlt. (38)

Eine ganze Reihe von Autoren befaßt sich mit den Ursachen dieser Veränderung. Zunächst ermittelte man die Existenz zweier Faktoren, eines Tumorzellfaktors sowie eines Serumfaktors, deren Interaktion die fibrinolytische tumorspezifische Aktivität bedingt. Auch normale Seren enthalten den Serumfaktor, sie aktivieren die Fibrinolyse jedoch nur, wenn man den Zellfaktor aus Tumorzellen hinzugibt.

Seren tumortragender Tiere enthalten zwar auch beide Faktoren, jedoch wird die Fibrinolyse durch einen wirtsspezifischen Inhibitor teilweise oder vollständig unterdrückt. (39)

Plasminogen wurde an anderer Stelle als Serumfaktor eindeutig nachgewiesen. (40)

Der Zellfaktor ist eine Arginin-spezifische Serin-Protease, die durch Tumorzellen gebildet und freigesetzt, Plasminogen irreversibel aktiviert. Diese Protease ist, gegenüber dem Ausgangsgewebe, i.e. Normalgewebe, bei Tumorzellen deutlich erhöht und scheint daher mit der Malignität der Zellen korreliert. Sie kann bei Applikation von Sojabohnen-Trypsininhibitor zu 95% gehemmt werden.

Auch bei tumortragenden Patienten wurde, wie beim Tier, (s.o.) eine erhöhte Zellfaktorinaktivatorkonzentration gemessen. (41)

Im in vitro-Versuch konnte weiterhin gezeigt werden, daß für das Auftreten der Wachstums-, Morphologie- und Mobilitätsänderungen der Zellen nach ihrer Transformation der Serumfaktor Plasminogen unerlässlich ist. (42)

Durch Verwendung einer temperaturabhängigen Mutanten des Rous-Sarkoma-Virus wurde demonstriert, daß in hohen Temperaturbereichen keine Fibrinolyse auftritt, aber auch die für die Transformation typischen Zustandsänderungen ausbleiben. Erst bei permissiven Temperaturen tritt beides miteinander korreliert auf.

Der Nachweis, ob der Zellfaktor synthetisiert oder aus intrazellulär vorhandenen Proteasen aktiviert wird, wurde noch nicht erbracht. Gesichert ist sein Auftreten in maligne transformierten Zellen, sein Fehlen in normalen Fibroblasten.

Jüngste Erkenntnisse sprechen von Rezeptoren für Plasmin, die ausschließlich an Zellmembranen maligne transformierter Zellen nachgewiesen sind, deren chemische Natur jedoch noch nicht identifiziert ist. (43, 44)

GOLDBERG konnte nachweisen, daß Zellkulturen mit nicht-transformierenden "avian leukosis" Viren (RAV-1 und RAV-2) den Plasminogen-Aktivatorspiegel nicht beeinflussen. Dagegen produzierten SR-RSV-A-transformierte Hühner-Embryofibroblasten sowie PR-RSV-C-transformierte Fibroblasten hohe Aktivatorkonzentrationen. Den gleichen Effekt zeigten RSV-, MSV- und SV40-transformierte Mäuse-Epithelzellen. Sehr instruktiv war GOLDBERGS Messung der zeitlichen Korrelation zwischen der morphologisch sichtbaren Transformation und der Aktivatorproduktion; diese erreichte ihr Maximum nach ca. 24 Stunden und damit sechs Stunden vor signifikanten morphologischen Veränderungen. Die Wirkung des Zellfaktors konnte durch folgende Inhibitoren gehemmt werden:

Sojabohnen-Trypsin-Inhibitor

Rinder-Pankreas-Inhibitor sowie zahlreiche synthetische Trypsin- und Chymotrypsininhibitoren. (45)

Der gleiche Autor hat in weiteren Arbeiten nachgewiesen, daß Plasmin, ebenso wie Trypsin, die DNS-Synthese stimuliert und "lectin agglutination sites" auf der Membranoberfläche untransformierter Zellen exponiert. Auf dem Boden aller Ergebnisse begründet GOLDBERG seine Hypothese; sie entspricht in ihren Grundzügen den Membranmodellen der Arbeiten, die sich, wie bereits ausgeführt, mit den proteolytisch wirkenden Tumoren befassen. Unter den plasminbedingten Membranveränderungen verlieren die Zellen ihre natürliche Kontaktinhibition und erleiden die typischen morphologischen Veränderungen, die auch OSSOWSKY schon mit der Plasminogenaktivierung in Zusammenhang gebracht hatte. (46, 47)

I. 7. PROTEASENAPPLIKATION ALS TUMORTHERAPIE

Ich möchte jetzt auf den klinischen Aspekt der Tumorbekämpfung eingehen. Er ergibt sich aus dem bisher dargestellten und ist auch Gegenstand meiner Versuche.

TROLL reduzierte durch die Applikation synthetischer Proteaseninhibitoren ein Tumorwachstum, das durch 7, 12-Dimethylbenzanthracen initiiert und durch Croton-Öl unterstützt wurde. Er verwendete als Versuchstiere Mäuse, die er subkutan impfte, als Inhibitoren TLCK, TPCK und TAME. TLCK (= tosyl lysin chloromethyl keton) sowie TPCK (= tosyl phenylalanin chloromethyl keton) hemmen Trypsin und Chymotrypsin durch kovalente Bindung an Histidin in deren aktivem Zentrum; TAME (= tosyl arginin methyl ester) stellt einen kompetitiven Inhibitor für Trypsin und Papain dar. (48)

Ebenso instruktiv verliefen die Versuche von LATNER et al., die an Mäusenieren-Explantaten durchgeführt wurden. Er applizierte Trasylol in die Kulturen und bestimmte deren Invasion durch Polyoma-Virus-transformierte BHK 21 Zellen. Die M-Untereinheit der Laktatdehydrogenase benutzte er als Parameter, denn sie ist in maligne transformierten - sowie Tumorzellen signifikant erhöht, wie bereits YASIN und GOLDENBERG 1966 mittels elektrophoretischer Bestimmungen nachweisen konnten.

LATNER ermittelte nun, daß in den Kulturen nach Aprotinin- (Trasylol) Behandlung der Prozentsatz der M-Untereinheiten nicht signifikant verändert war und auch eine Invasion durch maligne transformierte Zellen verhindert werden konnte. Er schloß daraus auf die Bedeutung der Proteasen in transformierten Zellen und zeigte zugleich, daß er deren Wirkungsmechanismen, nämlich das Wachstumsverhalten kultivierter Zellen zu verändern, blockieren konnte. (49)

Im weiteren wurden die Möglichkeiten der Tumorthherapie auch im in-vivo-Versuch beleuchtet. Man infizierte syrische Hamster mit maligne transformierten Rattenleberzellen (BHK 21/C 13), die einen stark metastasierenden Tumor entstehen ließen. C3H-Mäusen überimpfte LATNER spontan entstandene Säugetieradenokarzinomzellen.

Nach einwöchiger Inkubationszeit wurden variable Mengen Aprotinin appliziert a) subkutan

b) intraperitoneal

und c) direkt in den Tumor.

Für Hamster ergaben sich

a) keine signifikanten Gewichtsunterschiede der Tumoren, jedoch zeigte die behandelte Gruppe bereits Gewebse Nekrosen; Metastasierung konnte nicht vollständig gehemmt werden.

b) ebenfalls keine Reduktion der Tumormasse, aber vollständige Hemmung der Invasibilität und erhöhte Nekroseneignung im Tumor.

c) vollständiger Rückgang eines Tumors, Nekrotisierung und Rundzelleninfiltrat der übrigen Tumoren; hier zeigte die niedrigste Aprotinindosis die besten Ergebnisse.

Die Resultate der Mäuseversuche sind obigen vergleichbar, wobei die Hemmung des äußerst invasiven Karzinoms sehr eindrucksvoll durch Nekrosen und Rundzelleninfiltrate vollzogen wurde. (50)

Im Gegensatz zu den Modellen anderer Autoren stellte LATNER eine eigene Hypothese auf. Er glaubt, daß die proteolytischen Enzyme die malignen Zellen vor der immunologischen Überwachung des Organismus schützen, z.B. durch Inaktivierung spezifischer Antikörper gegen diese malignen Zellen. Der Inhibitor verhindert dies, erlaubt so die zelluläre Antwortreaktion und damit die Repression des Tumors.

I. 8. ERHÖHTE ALPHA-1-ANTITRYPSINKONZENTRATION IM PLASMA TUMORKRANKER PATIENTEN

An ihre Therapieversuche anknüpfend untersuchten LATNER et al die alpha-1-Antitrypsin- (=AAT) Konzentration im Plasma von Frauen mit Gebärmutterhalskrebs. Bei Frauen mit positivem Abstrichbefund ermittelten sie im Vergleich zu denen mit negativem Befund einen erhöhten AAT-Spiegel.

Bei Patienten mit bereits klinisch diagnostizierbarem Karzinom war die Konzentration erheblich erhöht. Als die Autoren die Dynamik des AAT-Spiegels betrachteten, stellten sie fest, daß die Antitrypsinzunahme im Plasma mit dem Tumorwachstum parallel verlief. Eine Signifikanz im Zuwachs ergab sich allerdings erst bei der invasiven Ausbreitung des intraepithelialen Karzinoms in eine Drüse oder in die Basalmembran. Die Tumorausbreitung auf andere Gewebe und Organe war wiederum nicht mehr mit signifikanten Änderungen der AAT-Konzentration verbunden.

Aus diesen Ergebnissen schloß LATNER auf eine Verknüpfung zwischen Mikroinvasion und erhöhter AAT-Konzentration im Blut, zumal die Reaktion des Organismus, den Inhibitor zu bilden, in einem Stadium erfolgte, als noch keinerlei klinische Anzeichen für eine maligne Entartung gegeben waren. Man kann also die AAT-Erhöhung durchaus als unmittelbare Antwort auf das Karzinom verstehen, die zeitlichen Zusammenhänge lassen einen indirekten Mechanismus zumindest unwahrscheinlicher erscheinen. (51)

Ein anderer Autor untersuchte Patienten mit Lungenkrebs. Bei Personen mit obstruktiver Lungenerkrankung war ein verminderter alpha-1-Antitrypsinspiegel gemessen worden; im Gegensatz dazu ergab die AAT-Messung bei 73 Lungenkrebspatienten eine Erhöhung, wobei der Grad der Abweichung vom jeweiligen Zelltyp des Karzinoms abhängig war. Patienten, die neben Lungenkrebs eine begleitende pulmonale Infektion aufwiesen, lieferten die absolut höchsten AAT-Konzentrationen.

Es werden weitere, jedoch noch unveröffentlichte Ergebnisse von HARRIS et al. erwähnt, die eine Inhibitorerhöhung auch bei Patienten ermittelten, deren karzinomatische Veränderungen außerhalb der Lungen lokalisiert waren. (52)

Auch MIESCH et al. berichten von einem 2-fachen Zuwachs des AAT-Spiegels bei acht Krebspatienten. (53)

Schließlich möchte ich noch eine Arbeit von SNYDER und ASHWELL erwähnen, in der quantitative Bestimmungen der Serum-Karbohydrat- und Serum-Glycoprotein-Konzentration durchgeführt wurden. Diese verglich man mit den Serumwerten normaler sowie chronisch kranker Kontrollpersonen. Von den 15 untersuchten Glycoproteinen waren sieben unverändert, drei, darunter auch alpha-1-Antitrypsin, sowohl bei Krebs- wie bei chronisch Kranken erhöht. Zwei Glycoproteine zeigten nur bei Krebspatienten eine Zunahme, während drei sogar eine Konzentrationsabnahme im Serum erkennen ließen. Unter den sieben unveränderten Glycoproteinen befand sich auch alpha-2-Makroglobulin.(54)

**SCHEMATISIERTER
WIRKUNGSMECHANISMUS
DES
TRYPSIN - INHIBITORS**

oberflächengrüne

fibrin matrix

fibrinolysin-komponente plasma



fibrinolysin-komponente zelle

fibrinolysin



trypsin inhibitor



II. MATERIAL UND METHODEN

Männliche und weibliche Sprague-Dawley-Ratten mit einem durchschnittlichen Gewicht von 150-200g dienten uns als Versuchstiere; sie wurden ad libidum mit Altromin-Pellets und Wasser ernährt. Als Tumor verwendeten wir das Walker-Karzinom 256 aus eigenen Passagen.

II. 1. IMPFTECHNIK

Das Tumorgewebe erhielten wir von Ratten, die nach Betäubung mit 0,2ml Vetalar (100mg/ml) durch Genickschlag getötet wurden. Die Aufbereitung des von Muskel- und Bindegewebe sowie Nekrosen gesäuberten Tumors erfolgte zunächst durch mechanische Zerkleinerung in der Embryonenquetsche. Danach wurde der Tumor im Mörser homogenisiert und in Hank'scher Lösung suspendiert. Das Verhältnis zwischen Lösung und Tumorphomogenat betrug 5 : 1.

0,5ml dieser Lösung überimpften wir den Ratten, die wiederum mit Vetalar betäubt wurden. Dabei wurde eine V₂A-Stahlkanüle der Größe 1405/15 verwendet, die eine gleichmäßige Tumorzellverteilung subfascial im Nackenbereich der Tiere ermöglichte. Ein Aliquot der Suspension untersuchte das Hygiene-Institut der Universität Marburg auf mikrobielle Verunreinigungen.

Die im diagnostischen Teil der Arbeit benötigten Tumortiere gewannen wir in einem Zeitraum von drei Wochen nach der Transplantation. Die Tumoren wurden in toto extirpiert und die bindegewebige Kapsel entfernt. Entsprechend den danach ermittelten Gewichten ordneten wir die Tiere in vier Gruppen ein.

Zur Bestimmung der Antitrypsinkonzentration im Plasma wählten wir vier Gewichtsklassen:

- | | |
|------------|-------------------|
| Gruppe I | : 1- 5g |
| Gruppe II | : 5- 15g |
| Gruppe III | : 15- 25g |
| Gruppe IV | : 25g und darüber |

II. 2. BLUTGEWINNUNG

Wir betäubten und töteten die Tiere wie unter II. 1. geschildert, um unmittelbar danach über den eröffneten Thorax das freiliegende Herz zu punktieren. Dies erfolgte mittels einer mit Liquemin 5000 heparinisierten Spritze. Die aufgesteckte Braunkanüle hatte die Maße 1,1 x 30 mm.

Durch diese Technik war die Gewinnung eines gerinnungs- und hämolysefreien Blutes gewährleistet; beide Faktoren stellten Vorbedingungen für eine zuverlässige photometrische Bestimmung der zu diskutierenden Blutbestandteile dar.

II. 3. ALPHA-1-ANTITRYPSINBESTIMMUNG

Die zu dieser Bestimmung notwendigen methodischen Kenntnisse entnahmen wir der Anleitung im H.U. BERGMAYER: Methoden der enzymatischen Analyse, pp 1023 - 1029, Verlag Chemie Weinheim, Bergstraße, 1970.

Die einzige methodische Abweichung zu BERGMAYER lag in der Verwendung von Blutplasma statt Serum. Daß diese Variante möglich ist, wurde durch folgenden Versuch nachgewiesen: Wir entnahmen einer Versuchsperson aus der Armvene Blut, das wir zum einen Teil heparinisierten, d.h. ungerinnbar machten, zum anderen Teil gerinnen ließen. Beides wurde zehn Minuten lang bei 500 Umdrehungen pro Minute (U/min) zentrifugiert, wodurch wir eine Plasma- und eine Serumprobe der Versuchsperson erhielten. Nach den im folgenden beschriebenen Methoden ermittelten wir die alpha-1-Antitrypsinkonzentration für

a) Plasma: 2, 198 IU/ml und

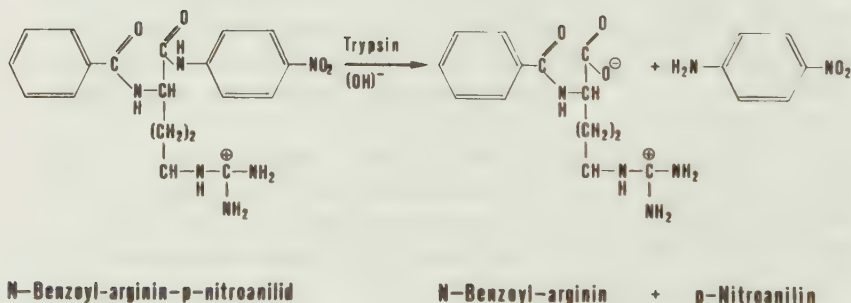
b) Serum : 2, 168 IU/ml.

Diese Konzentrationen stellen gemittelte Werte aus zehn Messungen dar und sagen aus, daß bei methodisch bedingter Abweichung von $\pm 5\%$ die Verwendung von Plasma anstelle von Serum möglich ist.

Demzufolge konnten wir also das gerinnungs- und hämo-lysefreie Blut bei 500 U/min zehn Minuten lang zentri-fugieren, um dann den Überstand, nämlich Plasma, in die Bestimmungen einzubringen.

PRINZIP

Bei der Messung bestimmten wir p-Nitroanilin, einen gelben Farbstoff, dessen Freisetzung wir anhand der Extinktionszunahme im Spektralphotometer bei 405 nm messen konnten und durch Umrechnung quantitativ er-mittelten. Der Farbstoff wird bei der tryptischen Spaltung von N-Benzoyl-arginin-nitroanilid (= BAPNA) freigesetzt.



BAPNA ist für Trypsin das am besten geeignete Substrat mit höchster Empfindlichkeit und Spezifität.

Durch die im Plasma der tumorkranken Ratten zugegebenen und von uns zu bestimmenden Proteaseninhibitoren nahmen wir im Bestimmungsansatz auf die oben dargestellte Reaktion Einfluß. Dabei verminderte sich die Bildung von p-Nitroanilin, da sich am aktiven Zentrum des Trypsinmoleküls ein Inhibitormolekül anlagerte und so einen inaktiven Enzym-Inhibitor-Komplex bildete.

HERSTELLUNG DER LÖSUNGEN

Alle Lösungen wurden mit frisch destilliertem Wasser hergestellt.

- I. Triäthanolamin-Puffer (0,2M Tra; pH=7,8; 20mM CaCl_2)
18,6g Tra und 1,47g $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ in 450ml Wasser lösen, mit 2N NaOH auf pH=7,8 einstellen, mit Wasser auf 500ml auffüllen
- II. Trypsin (50mg Protein/ml; 50mU/ml)
500mg Trypsin in 10ml 0,001N HCL lösen
- III. Substratlösung (2,2mM)
50mg BAPNA in 50ml Wasser durch Erwärmen im Wasserbad (bis 95°C) lösen.
- IV. Inhibitorlösung
Bei 30-70%iger Hemmung der vorgelegten Trypsinaktivität ist der Hemmgrad unabhängig von der Vorinkubationstemperatur zwischen 0 und 25°C und von der Vorinkubationsdauer zwischen 1 und 15 min.
Vorinkubat = Trypsin + Plasmaverdünnung + Puffer.
Um diesen Hemmgrad zu gewährleisten, ermittelten wir also in einem Vorversuch die benötigte Plasma-verdünnung.

Plasmaverdünnung mit NaCl -
lösung im Verhältnis

Hemmgrad in %

1 : 2	8,6
1 : 5	51,0
1 : 10	64,6
1 : 15	67,9
1 : 20	84,5
1 : 25	62,0
1 : 30	57,2
1 : 40	54,6
1 : 50	43,0

Die sich anbietende Verdünnung 1 : 40 liegt mit ihrem Hemmgrad bei 54,6%.

Der Hemmgrad errechnet sich wie folgt:

Setzen wir die Extinktionsänderung/ min des Vergleichsansatzes (= Trypsin + Puffer + Substrat) gleich 100%, ermitteln dann die Extinktionsänderung/ min des Inhibitoransatzes (= Vergleichsansatz + Plasmaverdünnung) in %, so ergibt sich der Hemmgrad aus der Differenz dieser beiden Prozentangaben.

BESTIMMUNGSANSATZ

Wir pipettierten in die Küvette:

A) Inhibitoransatz

B) Trypsinvergleichsansatz

0,2ml Trypsinlösung

0,2ml Trypsinlösung

1,7ml Tra-Puffer

1,8ml Tra-Puffer

0,1ml Inhibitorlösung

./.

Mischen und 5 min lang vorinkubieren

1ml BAPNA

1ml BAPNA

Wiederum mischen und über 5 min jede
Minute eine Extinktionsbestimmung

MESSUNG

Messtrahlung : 405nm
Schichtdicke : 1cm
Testvolumen : 3ml
Messung gegen Luft
Vorinkubationstemperatur : 25°C

Thermokonstante Küvettenhalter gewährten auch im Verlauf der Messung eine konstante Temperatur von 25°C.

BERECHNUNG

1mU Trypsin entspricht einer Extinktionsänderung von $\Delta E_{405} = 0,00332$ pro Minute im 3ml Ansatz. Eine Millieinheit des Inhibitors (= 1ImU) hemmt demnach den $\Delta E/\text{min}$ -Wert für Trypsin um denselben Betrag. Daraus ergibt sich für den Inhibitorgehalt der eingesetzten Probe:

$$\frac{(\Delta E/\text{min})_{\text{Tr}} - (\Delta E/\text{min})_{\text{In}}}{0,00332} \quad \text{ImU}$$

Da wir die Inhibitorlösung im Hinblick auf den Hemmgrad 1 : 40 verdünnt hatten, ergab sich die endgültige Inhibitorkonzentration im Plasma erst durch Multiplikation mit diesem Verdünnungsfaktor:

$$\frac{(\Delta E/\text{min})_{\text{Tr}} - (\Delta E/\text{min})_{\text{In}}}{0,00332} \quad 400 \text{ ImU/ml}$$

II. 4. NACHWEIS DES POLYVALENTEN TRYPSININHIBITORS ANTAGOSAN NACH I.P. - INJEKTION IM PLASMA DER RATTEN. TRASYLOLNACHWEIS ENTSPRECHEND

Methodische Anleitung aus: H.U. BERGMAYER:
Methoden der enzymatischen Analyse, pp 1025-1026

Plasmagewinnung: siehe II. 2. und II. 3. Den Tieren waren in verschiedenen Zeitaabständen vor ihrer Tötung bestimmte Mengen Antagosan intra-peritoneal injiziert worden.

PRINZIP

Durch Zugabe 6%iger Perchlorsäure wird im Plasma sämtliches Eiweiß ausgefällt. Dazu gehören auch die natürlich vorkommenden Inhibitoren, während die von uns applizierten synthetisierten Inhibitoren aufgrund ihrer Säurestabilität nachweisbar bleiben. Sie allein vermögen also im Bestimmungsansatz die Substratspaltung von Trypsin zu hemmen. Gelingt dieser Nachweis, ist damit sichergestellt, daß die applizierten Proteaseninhibitoren intravasal das Tumorgewebe erreichen.

HERSTELLUNG DER LÖSUNGEN

Alle Lösungen werden mit frisch destilliertem Wasser hergestellt.

- I. Triäthanolamin-Puffer (0,2M Tra; pH=7,8; 20mM CaCl_2)
18,6g Tra und 1,47g $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ in 450ml Wasser lösen, mit 2N NaOH auf PH= 7,8 einstellen, mit Wasser auf 500ml auffüllen
- II. Trypsin (50mg Protein/ml; 50U/ml)
500mg Trypsin in 10ml 0,001N HCl lösen
- III. Substratlösung (2,2mM)
50mg BAPNA in 50ml Wasser durch Erwärmen im Wasserbad (bis 95°C) lösen
- IV. Inhibitorlösung
1ml Plasma mit 1ml Eiswasser und 2ml 6%iger Perchlorsäure versetzen; zentrifugieren dieser Lösung bei 3000 U/min 10 Minuten lang. 3ml des Überstandes mit 5M K_2CO_3 -Lösung auf PH 4-7 einstellen, 1 Stunde lang bei 0-4°C aufbewahren. 0,1ml des Überstandes (Kaliumperchlorat ist ausgefallen) in den Test einbringen.

BESTIMMUNGSANSATZ

Wir pipettierten in die Küvette:

A) Inhibitoransatz

B) Trypsinvergleichsansatz

0,2ml Trypsinlösung	0,2ml Trypsinlösung
1,7ml Tra-Puffer	1,8ml Tra-Puffer
0,1ml Inhibitorlösung	./.
Mischen und 5min lang vorinkubieren	
1ml BAPNA	1ml BAPNA
Wiederum mischen und über 5min jede Minute eine Extinktionsbestimmung	

MESSUNG

Messtrahlung : 405nm

Schichtdicke : 1cm

Testvolumen : 3ml

Messung gegen Luft

Vorinkubationstemperatur : 25° C

Thermokonstante Küvettenhalter gewähren auch im Verlauf der Messung eine konstante Temperatur von 25°C.

BERECHNUNG

Die Berechnung weicht von der unter II. 3. angegebenen nur im Verdünnungsfaktor ab. Die Verdünnung erfolgte im Verhältnis 1:4, was sich aus der Vorbehandlung des Plasma mit 1ml Eiswasser und 2ml 6%iger Perchlorsäure ergab.

Die Inhibitorkonzentration berechnet sich also:

$$\frac{(\Delta E/\min)_{Tr} - (\Delta E/\min)_{In}}{0,00332} = 40 \text{ ImU/ml}$$

II. 5. NACHWEIS DES TRYPSININHIBITORS (400000IE) NACH I.P.-INJEKTION IM URIN DER RATTEN. (TRASYLOLNACHWEIS ENTSPRECHEND)

Methodische Anleitung aus: H.U. BERGMAYER :

Methoden der enzymatischen Analyse, pp 1026

URINGEWINNUNG

Betäuben und Töten der Tiere entsprechend II. 1. Über das eröffnete Abdomen wurde die Harnblase direkt punktiert. Den Tieren waren zuvor in verschiedenen Zeitabständen unterschiedliche Mengen Trasylol intraperitoneal injiziert worden.

PRINZIP

Im Urin gesunder Versuchstiere sind bei normaler Nierenfunktion keine Proteaseninhibitoren nachweisbar. Gelingt dieser Nachweis bei Trasylol-therapierten Ratten, so deutet dies auf die Resorption des polyvalenten Inhibitors nach der intraperitonealen Applikation hin.

HERSTELLUNG DER LÖSUNGEN

Alle Lösungen wurden mit frisch destilliertem Wasser hergestellt.

- I. Triäthanolamin-Puffer
- II. Trypsin
- III. Substratlösung siehe II. 4.
- IV. Inhibitorlösung

Der Urin der tumorkranken Tiere wird unverdünnt im Bestimmungsansatz verwendet.

BESTIMMUNGSANSATZ

siehe II. 4.

MESSUNG

siehe II. 4.

BERECHNUNG

Aufgrund des unverdünnt eingebrachten Urins errechnet sich die Inhibitor-Konzentration im Urin wie folgt:

$$\frac{(\Delta E/min)_{Tr} - (\Delta E/min)_{In}}{0,00332} \quad 10 \text{ ImU/ml}$$

II. 6. NACHWEIS DER TRYPSININHIBITOREN TRASYLOL UND ANTAGOSAN NACH I.P. - INJEKTION IM TUMORGEWEBE DER RATTEN

Methodische Anleitung aus: H.U. BERGMAYER:

Methoden der enzymatischen Analyse, pp 1025-1026

GEWINNUNG DES TUMORGEWEBES

Die kranken Tiere wurden in bestimmten Zeitabständen nach Applikation der Inhibitoren betäubt und getötet. (entsprechend II. 2.) Wir ließen die Ratten vollständig entbluten, um möglichst blutfreies Tumorgewebe entnehmen zu können.

PRINZIP

Durch Homogenisierung des Gewebes (Menge 1g) fällten wir mittels 6%iger Perchlorsäure sämtliches natürlich vorkommendes Eiweiß aus. Damit war sichergestellt, daß der angestrebte Nachweis von Inhibitoren im Bestimmungsansatz ausschließlich auf den säurestabilen Inhibitoren von Trasylol und Antagosan basieren würde.

HERSTELLUNG DER LÖSUNGEN

I. Triäthanolamin-Puffer

II. Trypsin

III. Substratlösung siehe II. 4.

IV. Inhibitorlösung

Nach Homogenisierung von 1g Gewebe, 1ml Eiswasser und 2ml 6%iger Perchlorsäure im Ultraturrax wurde das Homogenat bei 3000 U/min 10 min lang zentrifugiert. 3ml des Überstandes wurden mittels 5M K_2CO_3 -Lösung auf PH 4-7 eingestellt. Nach einstündigem Ablagern bei 0-4°C brachten wir 0,1ml des Überstandes in den Test ein.

BESTIMMUNGSANSATZ

siehe II. 4.

MESSUNG

siehe II. 4.

BERECHNUNG

siehe II. 4.

II. 7. BESTIMMUNG DER THROMBINZEIT

(mit dem Thrombinreagenz der Firma Boehringer Mannheim)

Anleitung aus BIGGS, R. und MAC FARLANE, R.G.:

Human Blood Coagulation and its Disorders, Blackwell
Scientific Publications, Oxford 1962

GEWINNUNG DES CITRATPLASMAS

9 Teile durch Herzpunktion frisch entnommenen Blutes wurden mit 1 Teil Natriumcitrat (0,1mol/l) gemischt und 10 min bei 3000 U/min zentrifugiert. Der Überstand geht in die Bestimmung ein.

PRINZIP

Natriumcitratzugabe bindet im Blut die Ca^{2+} -Ionen komplex, wodurch die Blutgerinnung und damit auch die Thrombinbildung innerhalb des Gerinnungssystems gehemmt werden. Durch Zugabe von Thrombin im Testansatz wird dieses System kurzgeschlossen und die Fibrinbildung ausgelöst. Dabei wird die Zeitdauer zwischen Thrombinzugabe und Gerinnungseintritt im Testansatz als Thrombinzeit bestimmt.

BESTIMMUNGSANSATZ

Thrombin-Reagenz auf 37°C vortemperieren. 0,2ml Citratplasma in ein Eppendorf-Pipetten-Röhrchen pipettieren, 2 min bei 37°C inkubieren.

Mit Zugabe von 0,2ml Thrombin-Reagenz Zeitmessung beginnen, bei Gerinnungseintritt, d.h. Bildung sichtbarer Fibrinfäden an einem Platinhäkchen, Messung beenden.

II. 7. S T A T I S T I K

Aus den Einzelwerten der Versuchsreihen wurden zunächst die Mittelwerte $\bar{x}$ und die Streuung des Einzelwertes berechnet. Anschließend wurde entsprechend dem T-Test nach Student, aus Freiheitsgrad, δ und Mittelwerten der untersuchten Gruppen die biologische Signifikanz auf dem 95%-Niveau (zweiseitige Hypothese) überprüft. Biologische Signifikanz liegt vor bei einem T-Wert $\geq 2,6$.

III.

ERGEBNISSE

EINZELWERTE DER VERSCHIEDENEN VERSUCHSREIHEN

III. 1. Alpha₁-Antitrypsin (Angaben in IU/ml_{Plasma})

Tab. I. Normalgruppe

N	Antitrypsin-Konzentration
1	3,31
2	3,27
3	3,57
4	3,45
5	3,09
6	2,83
7	3,07
8	3,15
9	3,11
10	3,05

Tab.II. Tumorgruppe mit Tumorgewicht von 0-5g

N	Antitrypsin-Konzentration	Tumorgewicht
1	2,81	0,7
2	3,01	0,8
3	2,59	1,0
4	2,49	1,4
5	2,65	1,5
6	2,45	2,5
7	2,11	3,5
8	2,73	4,6
9	2,32	4,7
10	2,57	4,8

Tab. III: Tumorgruppe mit Tumorgewicht von 5-15g

N	Antitrypsin-Konzentration	Tumorgewicht
1	2,09	7,3
2	2,63	8,0
3	2,41	8,2
4	2,45	8,7
5	2,53	8,7
6	2,14	11,6
7	2,37	11,9
8	2,57	13,0
9	1,95	14,8
10	2,52	15,0

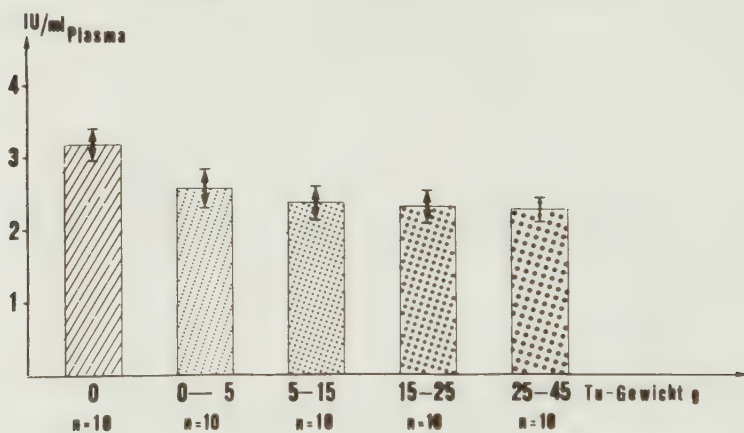
Tab. IV : Tumorgruppe mit Tumorgewicht von 15-25g

N	Antitrypsin-Konzentration	Tumorgewicht
1	2,19	17,0
2	2,19	17,6
3	2,17	18,0
4	2,67	18,0
5	2,05	18,8
6	2,43	19,1
7	2,37	19,3
8	2,11	21,0
9	2,29	22,2
10	2,71	23,2

Tab. V : Tumorgruppe mit Tumorgewicht von 25-45g

N	Antitrypsin-Konzentration	Tumorgewicht
1	2,47	25,0
2	2,25	25,0
3	2,49	25,3
4	2,35	27,5
5	2,19	29,8
6	2,37	30,0
7	2,31	33,5
8	2,25	33,5
9	2,11	35,7
10	1,95	41,0

III.1. Alpha_1 -ANTITRYPSIN



III. 2. EINZELNACHWEISE DER ANTIPROTEASEN

III.2.

ANTAGOSAN-NACHWEIS IM PLASMA

Tier	Antagosan i.p., Abstand 3 Std.	Blutentnahme nach ... Std.	IU/ml Plasma
1	0		0
2	2-1000 APE	1/2	0,301
3	11	1	0,376
4	11	2	0,275
5	11	3	0,251
6	11	5	0,145
7	11	7	0,120

III.3.

TRASYLOL-NACHWEIS IM PLASMA

Tier	Trasylof, i.p.	Blutentnahme nach ... Std.	IU/ml Plasma
1	0		0
2	20 000 KIE	1/4	0,289
3	11	1/2	0,328
4	11	1	0,283
5	11	2	0,275
6	11	3	0,145
7	11	4	0,089
8	11	5	0,116
9	11	7	0,046

III.4.

TRYPSIN-INHIBITOR-NACHWEIS IM URIN

Tier	Trypsin-Inhibitor, i.p.	Urinentnahme nach ... Std.	IU/ml Urin
1	0		0
2	II		0
3	II		0
4	400 000 IE	1/2	0,116
5	II	1	0,141
6	II	1 1/2	0,116
7	II	3	0,160
8	II	4	0,157
9	II	6	0,157

III.5.

TRASYLOL-NACHWEIS IM URIN

Tier	Trasylol, i.p.	Urinentnahme nach...Std.	IU/ml Urin
1	0		0
2	0		0
3	0		0
4	20 000 KIE	1/4	0
5	11	1/2	0
6	11	1	0
7	11	1 1/2	0
8	11	2	0
9	80 000 KIE	1/4	0
10	11	1/2	0,113
11	11	1	0,119
12	11	1 1/2	0,119
13	11	2	0,119

III.6.

TRASYLOL-NACHWEIS IM TUMOR

Tier	Trasylol, i.p.	Gewebsentnahme nach ... Std.	IU/g Tu-Gewebe
1	0		0
2	20 000 KIE	1	0,031
3	80 000 KIE	$\frac{3}{4}$	0,086
4	11	$1\frac{1}{4}$	0,167

III. 3. ANTIPROTEASETHERAPIE

III.7.

TRASYLOL-THERAPIE

20 000 KIE, i.p.,

2 Std. vor Tumorüberimpfung

Todestag	TrasyloI-Tiere n=10	NaCl-Tiere n=10
1.		
2.		
3.		
4.		
5.		
6.		
7.		
8.		
9.		
10.		
11.		
12.		
13.		
14.	■	■
15.		
16.	■	
17.		■
18.	■ ■	
19.		
20.	■ ■	
21.		
22.	■	■ ■
23.	■	■ ■
24.		
25.	■	■
26.		■
27.	■	
28.		
29.		
30.		
31.		■ ■
32.		■

III.8.

ANTAGOSAN-THERAPIE

2×1000 APE, i. p.

5 bzw. 3 Std. vor Tumorüberimpfung

Todestag	Antagosan-Tiere n=10	NaCl-Tiere n=10
1 .		
2 .		
3 .		
4 .		
5 .		
6 .		
7 .		
8 .		
9 .		
10 .		
11 .		
12 .		
13 .	■ ■	■ ■ ■ ■
14 .		■
15 .		■
16 .	■	■ ■
17 .	■ ■	
18 .	■ ■	
19 .	■ ■	■
20 .	■ ■	■ ■

III.9.

ANTAGOSAN-THERAPIE

500 APE, i.p., täglich

Todestag	Antagosan-Tiere n= 10	NaCl-Tiere n= 10
1 .	THERAPIEBEGINN	
2 .		
3 .		
4 .		
5 .		
6 .		
7 .	■ ■	■ ■
8 .	■	■ ■
9 .	■ ■	■ ■ ■
10 .	■ ■ ■	■ ■ ■
11 .	■	
12 .	■	

III. 10.

TRYPSIN-INHIBITOR-THERAPIE

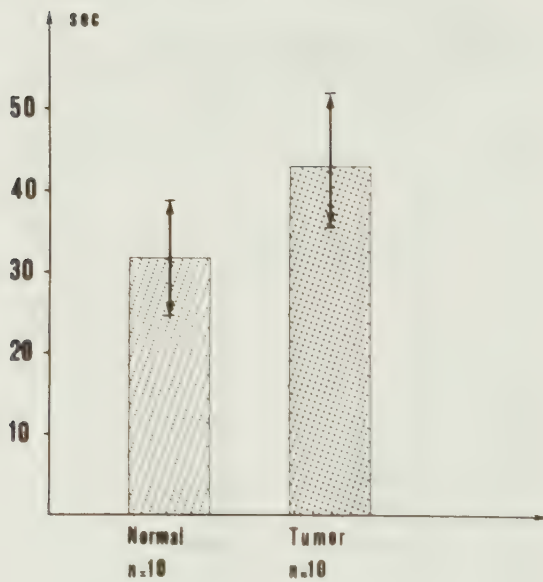
400 000 IE, i.p.,

1 Std. vor Tumorüberimpfung

Todestag	Trypsin-Inhibitor-Tiere n=10	NaCl-Tiere n=10
1		
2		
3		
4		
5		
6	■	
7		
8		
9		
10		■
11		
12		■
13		
14	■ ■ ■ ■	■
15	■ ■	■ ■
16	■	■ ■ ■
17	■	■
18		■
19	■	

III. 4. THROMBINZEIT

III.11. THROMBINZEIT



III. 5. HEPARIN-NACHWEIS

III.13.

HEPARIN-NACHWEIS IM PLASMA

Tier	Heparin (Liquemin 5000), l.p.	Blutentnahme nach...Std.	Thrombin- zeit in sec
1	0		25
2	0		36
3	0		31
4	1000 USP-E.	1	▲
5	11	5	▲
6	11	9	▲
7	11	20	40
8	2000 USP-E.	1	▲
9	11	5	▲
10	11	9	▲
▲ = kein Gerinnungseintritt in den ersten 2 Minuten			

III. 6. HEPARIN-THERAPIE

III.14.

HEPARIN-THERAPIE

1000 USP-E. Liquemin 5000. i.p.,

8 Std. vor Tumorüberimpfung

Todestag	Heparin-Tiere n=10	NaCl-Tiere n=10
1.		
2.		
3.		
4.		
5.		
6.		
7.		
8.		
9.		
10.		
11.		
12.		■
13.	■ ■ ■ ■	■ ■ ■ ■
14.	■ ■	■ ■
15.	■ ■ ■	■ ■
16.		■
17.		■
18.		
19.	■	

III.15.

HEPARIN-THERAPIE

125 USP-E. Liquemin 5000, i.p., täglich

Todestag	Heparin-Tiere n=10	NaCl-Tiere n=10
1.		
2.		
3.	THERAPIEBEGINN	
4.		
5.		
6.		
7.		
8.	■	
9.		
10.	■	■ ■
11.	■	■ ■
12.	■	■ ■ ■
13.	■ ■ ■	■ ■ ■
14.	■	
15.	■	
16.	■	

III. 7. ERGEBNISSE: Fortsetzung

Tab. I-V: Antitrypsinkonzentration im Plasma mit zugehörigem Tumorgewicht.

In der Tumorgruppe bis 5g ist der α_1 -Antitrypsinspiegel im Mittelwert auf 2,57 IU/ml abgesunken (Normalwert 3,19), d.h. er beträgt noch 80% des Normalwertes. Diese Abnahme ist im Signifikanzschema durch den T-wert 5,634 charakterisiert. In den übrigen 4 Tumorgruppen fällt die Inhibitorenkonzentration lediglich noch auf 71% des Normalwertes ab.

Diese Werte stehen im Gegensatz zu den bei LATNER veröffentlichten Ergebnissen, der bei Ratten mit stark metastasierenden Tumoren einen deutlichen Anstieg der Antitrypsinkonzentration ermittelt hat.

In Abb. III. 1. wird der initiale Abfall des Inhibitorengehaltes bei der Tumorgruppe bis 5g verdeutlicht, in den übrigen Gruppen bis 45g Tumorgewicht sinkt er nur noch geringfügig ab.

Inhibitorennachweise:

Im Hinblick auf unseren therapeutischen Teil führten wir zunächst zahlreiche Nachweise, die in den Tabellen III.2. bis III.6. zusammengefaßt sind, durch.

Zunächst wird sichergestellt, daß Antagosan (2x1000 APE) und Trasylol (2000 KIE) noch nach sieben Stunden im Plasma der Ratten nachweisbar sind. (Tab. III.2. und III.3.)

Im Urin der Tiere wird Trasylol noch nach zwei Stunden ausgeschieden, jedoch ist dieser Nachweis von der Dosis abhängig (80000 KIE). Bei der Applikation von 20000 KIE Trasylol war nichts im Urin aufzufinden. (Tab. III. 5.). Der Trypsininhibitor (400000 IE) wird nach Tab. III.4. noch nach sechs Stunden im Urin nachgewiesen.

Aus der Tab. III.6. geht hervor, daß auch im Tumorgewebe kranker Ratten noch Inhibitoren aufzufinden sind, nachdem diesen 20000 bzw. 80000 KIE Trasylol appliziert worden sind.

Unsere Therapieversuche sind in den Tabellen III.7. bis III. 10. zusammengefaßt. Es wird deutlich, daß bei den von uns gewählten Applikationsarten keinerlei Änderungen der Angeh- bzw. Überlebensrate bei den tumorkranken Ratten im Vergleich zu den NaCl-Tieren zu erkennen sind.

In der Gegenüberstellung der Versuchsreihen fällt auf, daß die Überlebensdauer abnimmt. Diese Erscheinung ist auf die von Passage zu Passage zunehmende Virulenz der Erreger zurückzuführen.

Abb. III.11. zeigt den deutlichen Anstieg der Thrombinzeit bei Tumortieren gegenüber Normaltieren.

Mittels des Thrombin-Testsatzes führen wir auch den Heparin-Nachweis im Rattenplasma, wobei nach Applikation von 1000 USP-E Heparin die Thrombinzeit noch nach 20 Stunden deutlich erhöht ist (III.13.).

Allerdings ergeben die Tabellen III.14. und III.15. keinerlei Anhaltspunkte für eine erhöhte Überlebensrate bzw. gesenkte Angehrate bei den Heparin-therapierten kranken Ratten gegenüber den Vergleichstieren.

III. 8. STATISTISCHE AUSWERTUNG

Zu III.1.

Alpha₁-**ANTITRYPSIN** (iU/ml Plasma)

Gruppen	$\bar{x}$	σ
Normalgruppe	3,18	0,21
Tu : 0 - 5 g	2,57	0,25
Tu : 5 - 15 g	2,36	0,22
Tu : 15 - 25 g	2,31	0,22
Tu : 25 - 45 g	2,27	0,16

Signifikanz-Schema

	Tu:0-5g	Tu:5-15g	Tu:15-25g	Tu:25-45g
Normalgruppe	5,634 = T-Wert			
Tu: 0 - 5 g		-1,862		
Tu: 5 - 15 g			-0,469	
Tu: 15 - 25 g				-0,438
Tu: 25 - 45 g				

Zu III.11.

THROMBINZEIT (sec)

Gruppen	$\bar{x}$	σ
Normalgruppe	31,60	7,10
Tumorgruppe	42,00	7,36

Signifikanz-Schema

Normalgruppe

Tumorgruppe



T-Wert = 3,049

IV.

DISKUSSION

Eine erhöhte proteolytische Aktivität im Gewebe von Tumoren ist in zahlreichen Veröffentlichungen nachgewiesen worden. Zelluläre Herkunft und Wirkungsmechanismen der Proteasen werden jedoch ebenso diskutiert wie eine Erhöhung der Antiproteasenkonzentration bei Tumorkranken.

Bei der Betrachtung der Proteasenwirkung in der Literatur erlangt die Zellmembran entscheidende Bedeutung.

KAPLAN und BONA (15) z.B. sehen proteolytisch bedingte ultrastrukturelle Veränderungen der Glycocalyx, KAST (14) spricht von "trigger-peptides", die, proteolytisch geteilt, die Zelltransformation auslösen. Andere (2,3) vermuten eine Abspaltung sterisch hindernder Peptide der Membranoberfläche. Nur wenige lokalisieren das proteolytische Geschehen innerhalb der Zellen, wo sie z.B. eine Aktivierung der DNS-Polymerase vermuten (12,13).

Während die oben erwähnten Arbeiten sich auf die Zugabe von Proteasen zu Normalzellkulturen beschränken, isolierten JANOFF, SCHERER und andere aus Lysosomen verschiedener Zelltypen Proteasen und Elastasen, die andere Zellen zur Blastenbildung anregten (20,21,18,19).

Schließlich war es WEISMANN, der nachwies, daß stimulierte Leukozyten lysosomale Proteasen freisetzen; demzufolge behauptete er, daß die endogenen Proteasen den Mechanismus der Blastenbildung in Gang setzen. (15).

Einem anderen Autor gelang es, diese Blastenbildung durch Zugabe von Proteolyseinhibitoren (TLCK, TPCK, ϵ -Aminocaproinsäure) zu stoppen (23,24).

Der Vergleich von Tumorzellen mit kurzzeitig proteolytisch behandelten Normalzellen ergab: die beobachteten Membranveränderungen führen zu vergleichbarem Agglutinationsverhalten normaler- und Tumorzellen. Die Zugabe von Leukämiezellen zu einer Normalzellkultur verursachte dort einen erheblichen Wachstumsimpuls (25).

Das letzte Ergebnis deutet bereits auf das hin, was HOLLBERG und SHAMBERGER berichten (28,29); bei Mäusen mit Hautkrebs war die Sekretion lysosomaler Enzyme in den Tumorzellen erheblich gesteigert. In transformierten 3T3 Zellkulturen waren die Glycosidase- und Proteasenkonzentration stark erhöht (30,31).

RUBIN isolierte aus RSV-transformierten Hühnerembryokulturen einen "overgrowth-stimulating-factor", den er nach vergleichenden Analysen als Protease oder Peptidase charakterisierte. Auch der Zellfaktor, den zahlreiche Autoren in ihren Untersuchungen zur fibrinolytischen Aktivität von Tumoren isolierten, konnte schließlich von RIFKIN als Arginin-spezifische-Serinprotease erkannt werden (41).

CLIFTON hatte bereits bei Patienten mit Brustkarzinomen, bestimmten Adenokarzinomen des Dickdarms sowie Sarkomen eine erhöhte Plasminogenaktivatorproduktion ermittelt (36); mit Tumurviren infizierte Fibroblastkulturen zeigten das gleiche. (38). In normalen Zellen konnte im Vergleich zu maligne transformierten Zellen die Protease nicht isoliert werden (39,40). GOLDBERG gelang es, die erhöhte Aktivatorproduktion transformierter Hühnerembryofibroblasten und Mäuseepithelzellen mittels Inhibitoren zu hemmen (Sojabohnen-Trypsininhibitor, Rinderpancreas-Inhibitoren, synthetisierte Trypsin- und Chymotrypsininhibitoren) (45).

Eine mit der erhöhten fibrinolytischen Aktivität von Tumorgewebe korrelierte gesteigerte Antiproteasenkonzentration ist bisher noch von wenigen Autoren untersucht. Hauptvertreter in dieser Gruppe ist LATNER, der zunächst bei Frauen mit Gebärmutterhalskrebs eine zum Tumorstadium parallel verlaufende Zunahme der α_1 -Antitrypsinkonzentration feststellte, wobei er eine deutliche Korrelation zwischen Mikroinvasion und Antiproteasenspiegel erkannte (51). Bei Lungenkrebspatienten ermittelte CURTIS, bei Patienten mit karzinomatösen Veränderungen außerhalb der Lungen HARRIS und MIESCH einen zelltypabhängigen Antitrypsinanstieg (52,53).

LATNER und TROLL zogen schließlich aus allen Erkenntnissen die Konsequenz einer Tumorthherapie mittels Antiproteasenapplikation. Dabei reduzierte TROLL bei tumorkranken Mäusen durch Gabe der Inhibitoren TLCK, TPCK, TAME das Tumorstwachstum (48). LATNER hemmte die Invasion eines Mäusenierent-Explantates durch Polyoma-Virus-transformierte BHK-21-Zellen, indem er Aprotinin (Trasylol) applizierte (49). Auch im in vivo-Versuch mit syrischen Hamstern, die mit einem stark metastasierenden Tumor infiziert waren, gelang ihm eine Beeinflussung des Tumorstwachstums unter Trasylol-Therapie.

Unsere Ergebnisse unterscheiden sich teilweise von den oben dargestellten.

1. Während für α_1 -Antichymotrypsin noch ein, nicht jedoch signifikanter Anstieg im Plasma der Tumortiere zu messen war, zeigte die Bestimmung der α_1 -Antitrypsinkonzentration einen geringen Abfall.

Bei dem Walker Karzinom 256 handelt es sich um einen nicht metastasierenden malignen Tumor. LATNER verwandte hingegen einen stark metastasierenden, invasiv wachsenden Tumor. Möglicherweise liegt in der Bildung von Lebermetastasen und der dadurch ausgelösten Cholestase die Ursache für die α_1 -Antitrypsinkonzentrationszunahme, die LATNER in seiner Arbeit anführt.

2. Die Bestimmung der Thrombinzeit ergab eine signifikante Erhöhung bei tumorkranken Ratten.

Dieses Ergebnis steht durchaus im Einklang mit den seither veröffentlichten Arbeiten, die eine erhöhte fibrinolytische Aktivität im Serum tumorkranker Tiere nachweisen konnten.

3. In den Versuchen unseres therapeutischen Teils konnten wir bei der Antiproteasentherapie der Rattentumoren weder bezüglich der Angehrate noch der Sterberate eine signifikante Veränderung gegenüber den Vergleichstieren feststellen.

Unsere Therapieversuche sind dennoch durch die von zahlreichen Autoren nachgewiesene Proteasenzunahme in Tumoren ge-

rechtfertigt, wenn wir auch im diagnostischen Teil unserer Arbeit keine Inhibitorenzunahme ermitteln konnten.

Daß die von uns applizierten polyvalenten Inhibitoren von den Tieren nach der intraperitonealen Injektion resorbiert wurden, konnten wir sicherstellen. Im Plasma und Urin wie auch im Tumorgewebe der Ratten fanden wir noch nach erheblichen Zeitabständen nachweisbare Inhibitorenkonzentrationen. Warum diese Konzentrationen dennoch wirkungslos blieben, führen wir auf zwei Ursachen zurück:

- a) Die Spezifität der Inhibitoren reicht nicht aus, um das Wachstum der Tumorzellen entscheidend zu hemmen.
- b) Applikationsart sowie Fraktionierung und Dosierung waren falsch gewählt.

In den Versuchen zur Ermittlung der Angehrate variierten wir sowohl das Präparat, als auch die Zeitabstände zwischen Applikation und Tumorüberimpfung. Ähnlich differenzierten wir bei den Überlebensrate-Versuchen; hier applizierten wir täglich, verschiedene Präparate und diese in stark unterschiedlichen Dosierungen.

Nach den Ergebnissen ist zu vermuten, daß zum Therapieerfolg die Inhibitoren öfter als einmal pro Tag verabreicht werden müssen, um die Plasmainhibitorenkonzentration auf einem zur erfolgreichen Therapie hoch anzusetzenden Konzentrationsniveau zu halten.

V. ZUSAMMENFASSUNG

Zur Fragestellung der tumorinduzierten gesteigerten Aktivität von Anti-Proteasen wurden zunächst Verlaufskontrollen der α_1 -Antitrypsinaktivität bei 150-200g schweren männlichen Sprague-Dawley-Ratten mit Walker-Karzinom 256 erstellt. Die in Abhängigkeit vom Tumorgewicht bestimmten α_1 -Antitrypsinkonzentrationen zeigten allerdings einen leichten, nicht signifikanten Rückgang. Dieses Ergebnis stand im Gegensatz zu zahlreichen, in der Literatur angegebenen Versuchsreihen, bei denen eine tumorbedingte Zunahme der Antiproteasenaktivität gemessen wurde.

Im therapeutischen Teil wurden zu Anfang Einzelnachweise der applizierten polyvalenten Trypsininhibitoren Trasylol, Antagosan sowie des Antithrombins Heparin im Plasma, Urin beziehungsweise im Tumorgewebe der tumor-kranken Ratten geführt. Die dabei ermittelten Werte zeigten: in Abhängigkeit von der Konzentration der Trypsininhibitoren sind diese noch nach Stunden bei den Tieren nachweisbar.

Bei der Bestimmung der Angeh- und Überlebensrate der therapierten Tiergruppen konnte gegenüber den Vergleichsgruppen keine signifikante Änderung der Parameter festgestellt werden.

Literaturverzeichnis

- 1) BERGMAYER, H.U. (1970) Methoden der enzymatischen Analyse. 2. Auflage, Verlag Chemie, Weinheim/Bergstr.
- 2) SEFTON, B.M.
RUBIN, H. (1970) Release from density dependent growth inhibition by proteolytic enzymes. Nature 227, 843-845
- 3) GOODALL, D.M. (1971) Lymphocyte surface components, I. Stimulation of enzyme-treated rabbit lymphocytes by non-specific mitogens. Clin. Exp. Immunol. 9, 645-655
- 4) BURGER, M.M. (1970) Proteolytic enzymes initiating cell division and escape from contact inhibition of growth. Nature 227, 170-171
- 5) KAMBARA, T.
NOHARA, Y. (1966) Mitotic changes in rat liver after intraperitoneal papain protease. Arch. Path. 81, 525-530
- 6) LAN BO CHEN,
BUCHANAN, J.M. (1975) Mitogenic activity of blood components. I. Thrombin and prothrombin. Proc. Nat. Acad. Sci. (USA) 72, 131-135
- 7) LASNITZKI, I. (1955) The effect of excess vitamin A on mitosis in chick heart fibroblasts in vitro. Exper. Cell Res. 8, 121-125

- 8) YAMAMOTOM, K. (1973) In vivo Effects of proteases on cell surface architecture and cell proliferation in the liver. *Cancer Res.* 33, 567-572
- 9) SEELICH, F. (o.J.) Are lysosomal enzymes involved in regulation of cell proliferation? *Österr. Zeitschr. f. Onkologie* Vol. 2, No. 2-3
- 10) ALLFREY, V.G. (1963) On the role of histones in regulating ribonucleic acid synthesis in the cell nucleus. *Proc. Nat. Acad. Sci. (USA)* 49, 414-421
- 11) HIRSCHHORN, R. (1969) Template activity of nuclei from stimulated lymphocytes. *Nature* 222, 1247-1250
- 12) BROWN, R.L.
STUBBLEFIELD, L. (1974) Enhancement of DNA synthesis in a mammalia cell-free system by trypsin treatment. *Proc. Nat. Acad. Sci. (USA)* 71, 2432-2434
- 13) TOSI, L.
SCARANO, E. (1973) Effect of trypsin on methylation in isolated nuclei from developing sea urchin embryos. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 55, 470-476

- 14) KAST, R.T. (1974) A theory of lymphocyte blast transformation (LBT) and malignant change based on proteolytic cleavage of a trigger peptide: the detender. Oncology 29, 249-264
- 15) KAPLAN, J.G.
BONA, C. (1974) Proteases as mitogenes. The effect of trypsin and pronase in mouse and human lymphocytes. Exper. Cell Res. 88, 388-394
- 16) WRIGHT, P.
QUASTEL, M.R. &
KAPLAN, J.G. (1972) Proc. 6 th leukocyte culture conf. (ed. R. Schwarz) Academic Press, New York 185
- 17) WEISSMANN, G.
ZURIER, R.B. &
HOFFSTEIN, S. (1972) Am. j. pathol. 68, 539
- 18) DAVIES, P. (1971) Characterization of a neutral protease from lysosomes of rabbit polymorphonuclear leucocytes. Biochem. J. 123, 559-569
- 19) JANOFF, A.
SCHERER, J. (1968) Mediators of inflammation in leukocyte lysosomes. J. Exp. Med. 128, 1137-1151
- 20) TCHÓRZEWSKI, H. (1973) A new lymphocyte transforming factor derived from the lysosomes of polymorphonuclear leucocytes. Experientia 29, 481-483

- 21) TCHÓRZEWSKI, H. (1972) The role of lysosomes in lymphocyte transformation in vitro. Arch. Immun. Ther. Exper. 20, 831-835
- 22) HIRSCHHORN, R. (1968) Studies on lysosomes. XII. Redistribution of acid hydrolases in human lymphocytes stimulated by phytohemagglutinin. J. Cell Biol. 37, 412-423
- 23) HIRSCHHORN, R. (1971) The effect of epsilon amino caproic acid and other inhibitors of proteolysis upon the responses of human peripheral blood lymphocytes to phytohemagglutinin. J. Clin. Invest. 50, 1206-1217
- 24) FOX, T.O. (1971) Cyclic membrane changes in animal cells: Transformed cells permanently display a surface architecture detected in normal cells only during mitosis. Proc. Nat. Acad. Sci. (USA) 68, 244-247
- 25) BURGER, M.M. (1973) Surface changes in transformed cells detected by lectins. Fed.Proc. 32, 91-101
- 26) SCHNEBLI, H.P. (1972) A protease-like activity associated with malignant cells. Schweiz. med. Wschr. 102, 1194-1197

- 27) SYLVÉN, B. (1974) Immunofluorescent studies on the occurrence of cathepsin B 1 at tumor cells surfaces. Virchows Arch. B Cell Path. 17, 97-112
- 28) HOLMBERG, B. (1961b) Cancer Res. 21, 1386-1393
- 29) SHAMBERGER, R.J.
RUDOLPH, G. (1967) Increase of lysosomal enzymes in skin cancers. Nature 617-618
- 30) BOSMANN, H.B. (1972) Elevated glycosidase and proteolytic enzymes in cells transformed by RNA tumor virus. Biochim. Biophys. Acta 264, 339-343
- 31) BOSMANN, H.B. (1974) Release of specific protease during mitotic cycle of L5178Y murine leukaemia cells by sublethal autolysis. Nature 249, 144-145
- 32) SYLVÉN, B.
MALMGREN, H. (1957) Acta Radiol. Suppl. 154
- 33) BURGER, M. (1969) Proc. Nat. Acad. Sci. (USA) 62
- 34) RUBIN, H. (1970) Overgrowth stimulating factor released from rous sarcoma cells. Science 167, 1271-1272
- 35) FISCHER, A. (1925) Beitrag zur Biologie der Gewebszellen. Eine vergleichend biologische Studie der normalen und malignen Gewebszellen in vitro. Arch. Entwicklungsmechanik 104, 210-261

- 36) CLIFTON, E.E.
GROSSI, C.E. (1955) Fibrinolytic activity of human tumors as measured by the fibrin-plate method. Cancer 8, 1146-1154
- 37) POOLE, A.R.
WILLIAMS, D.C. (1968) The role of lysosomal enzymes in malignant growth. Biochem. J. 110, 6p-7p
- 38) UNKELESS, J.C. (1973) An enzymatic function associated with transformation of fibroblasts by oncogenic viruses. J. Exper. Med. 137, 85-111
- UNKELESS, J.C. (1974) Fibrinolysis associated with oncogenic transformation. J. Biol. Chem. 249, 4295-4305
- 39) OSSOWSKI, L. (1973) An enzymatic function associated with transformation of fibroblasts by oncogenic viruses. J. Exper. Med. 137, 112-126
- 40) QUIGLEY, J.P. (1974) Plasminogen, the serum proenzyme activated by factors from cells transformed by oncogenic viruses. J. Biol. Chem. 249, 4306-4311
- 41) RIFKIN, D.B. (1974) Properties of plasminogen activators formed by neoplastic human cell cultures. J. Exper. Med. 139, 1317-1328

- 42) OSSOWSKI, L. (1973) Fibrinolysis associated with oncogenic transformation.
J. Exper. Med. 138, 1056-1064
- 43) REICH, E. (1973) Tumor-associated fibrinolysis.
Fed. Proc. 32, 2174-2175
- 44) OSSOWSKI, L. (1974) Fibrinolysis associated with oncogenic transformation.
J. Biol. Chem. 249, 4312-4320
- 45) GOLDBERG, A.R. (1974) Increased protease levels in transformed cells: A casein overlay assay for the detection of Plasminogen activator production. Cell 2, 95-102
- 46) GOLDBERG, A.R. (1973a) In Conference on Biomedical Perspectives of Agglutinins of Invertebrate and Plant Origins. Annals of the New York Academy of Sciences meeting (New York) May 21-23, in press
- 47) GOLDBERG, A.R. (1973b) Abstracts of the Annual Meeting of the American Society of Microbiologists. p. 218
- 48) TROLL, W. (1970) Tumorigenesis in mouse skin: Inhibition by synthetic inhibitors of proteases. Science 169, 1211-1213

- 49) LATNER, A.L.
LONGSTAFF, E.
PRADHAN, K. (1973) Inhibition of malignant cell invasion in vitro by a proteinase inhibitor. Br. J. Cancer 27, 460-464.
- 50) LATNER, A.L.
LONGSTAFF, E.
TURNER, G.A. (1974) Antitumor activity of apro-tinin. Br. J. Cancer 30, 60-67
- 51) LATNER, A.L.
TURNER, G.A.
LAMIN, M.M. (1976) Plasma alpha-1-antitrypsin levels in early and late carcinoma of the cervix. Oncology 33, 12-14
- 52) CURTIS, C. et al (1974) Elevated alpha-1-antitrypsin serum levels in lung cancer patients. Cancer 34, 280-281
- 53) MIESCH et al (1971) Clin. Chim. Acta 31, 231-241
- 54) SNEYER, St.
ASHWELL, G. (1971) Quantitation of specific serum glycoproteins in malignancy. Clin. Chim. Acta 34, 449-455

Meine akademischen Lehrer waren folgende Herren Professoren
und Dozenten

AHRENS	SCHIENBEIN
AMON	SCHIFF
BALZER	SCHMID
BERNHARD	SCHMIDT
BODE	SCHMITZ-MOORMANN
BRAASCH	TREUDL
CASTENHOLZ	WENDT
DENHARD	WIEGAND
DIMROTH	
EISNER	
FRIEDERICH	
FUHRMANN	
HABERICH	
HENNIS	
HENSEL	
HERING	
HEUSER	
JANKE	
KARLSON	
KOECKE	
LANGE	
LEHMANN	
LUDWIG	
MAROSKE	
NIEMEYER	
PETRI	
RICHTER	
ROHEN	
SIEGERT	

LEBENS LAUF

Am 10. 08. 1951 wurde ich als Sohn des kaufmännischen Angestellten Werner Bäcker und seiner Ehefrau Hedwig, geb. Theis, in Marburg/Lahn geboren.

Nach dem Besuch der Grundschule Steinperf ab 1958 wechselte ich 1963 zum Gymnasium Lahntalschule Biedenkopf über, wo ich im Juni 1971 die Reifeprüfung ablegte.

Vom 1.1.1972 bis 15.10.1972 verkürzte Wehrpflichtzeit bei der Bundeswehr.

Im Wintersemester 1972/73 Zulassung zum Studium der Zahnmedizin an der Philipps-Universität Marburg.

Naturwissenschaftliche Vorprüfung am 31.8.1973

Ärztliche Vorprüfung am 14.3.1975

City Schnelldruck, Marcusstraße 10, 8700 Würzburg